

「脳を守る」

平成 10 年度採択研究代表者

長嶋 和郎

(北海道大学医学部 教授)

## 「ウイルス性脳障害の発症機構の解明と治療法の開発」

### 1. 研究実施の概要

ウイルス性脳障害の発症機構の解明およびその知見に基づく治療法を開発する為に、ヒト脳に進行性多巣性白質脳症 (Progressive multifocal leukoencephalopathy; PML)を惹起する JC virus (JCV)を対象とし、その脳組織特異性を以下のアプローチにより研究を行っている。

#### (1) JCV 受容体の研究

JCVの外殻蛋白を用いて作成した人工ウイルス (JCVのウイルス遺伝子を含まない殻だけの粒子)を作成し、粒子の形態をとることを電子顕微鏡、免疫電顕で確認した。さらに人工ウイルスが霊長類のみならず、マウスやラット等のげっ歯類細胞等に対して幅広く細胞内に侵入し核内へ到達すること、この侵入はシアリダーゼにより消失することを蛍光色素で標識した人工ウイルスを用いて明らかにした。以上の結果からJCVの脳組織特異性は受容体非依存性であり、神経特異的転写因子等により特異性が規定されていることが明らかとなった。さらにこの人工ウイルスを遺伝子治療用のベクターとして利用することを試みている。人工ウイルスを低浸透圧の条件下にすることにより、一時的に粒子を解離させ、その際蛍光を発する外来遺伝子を殻の中に取り込ませ、この蛍光発色遺伝子を含んだ人工ウイルスを細胞に吸着させ、経時的に観察を行い、細胞に蛍光蛋白が発現することを確認した。このように人工ウイルスが外来遺伝子を細胞に運搬するベクターとしての役割を持つことを証明した。今後はウイルス蛋白のアンチセンスDNAおよびRNAiを人工ウイルスに取り込ませてJCVの増殖を抑制することを試み、さらに、神経系細胞特異的に人工ウイルスが運ばれるようベクターに神経特異的に発現している蛋白の抗体を結合させて、神経特異的なベクターを開発する。

#### (2) 神経特異的転写因子の研究

受容体の研究により、JCV の神経組織特異性は細胞の転写調節因子により制御されていることが示唆された。神経特異的転写因子の単離を行なう為に以下の実験を行っている。

JCV 感染細胞から JCV の種々のクローンを単離した後、調節領域を増幅し、塩基配列を検索する。調節領域の塩基配列を比較することにより全てのクローンで共通している塩基配列を決定して、その配列を基にしてプローブを作成し神経系細胞および非神経系細胞の核分画を抽出してゲルシフトアッセイを行ない、差異が有るプローブを決定する。さらに UV クロスリンク法を用いてプローブ

ブと特異的に結合する蛋白をバンドとして認識し、種々のカラムを用いて転写因子を単離する。単離後はこの転写因子結合領域を基にして、神経系でのみ発現が on となる vector を作成する。

### (3) JCV の後期蛋白 agnoprotein (agno) に関する研究

我々は機能が不明である agno の抗体を作製して、感染細胞での agno の局在が主に核周囲の細胞質であり、細胞質ではチュブリンと結合していること、agno 欠損ウイルスはウイルス蛋白の翻訳が抑制されること、agno は JCV 早期蛋白である large T 抗原に結合することを報告した。JCV agno の NLS-/NES-like motif の mutant を作製して agno の局在の変化およびリン酸化と細胞内局在との関係について検討することを試みた。JCV agno は感染細胞の細胞質と核周囲に局在したが、NLS/NES motif の mutant を用いた実験より、agno の細胞質局在は NES に依存すること、NLS もその機能を保持していることが示された。また agno は 5 ヶ所のリン酸化部位を有していた。このうち 3 ヶ所は NLS motif の近傍に位置し、リン酸化の有無は局在の変化に関与しなかった。感染細胞における agno の局在および局在化シグナルの検討から、agno は核内外を移行する shuttle 蛋白であり、他の蛋白の細胞内移行に関与し、ウイルスの増殖に寄与していることが予想された。

## 2. 研究実施内容

### 研究目的:

本研究は、ウイルスから“脳を守る”ことを主眼とする。ウイルスによる脳の障害は多くの場合致命的であるが、その大きな理由の1つは、脳血管疾患とは異なり、ウイルスによる障害ではその病変が脳の広範囲にわたることである。また、脳血管疾患では画像診断が発達しており、手術による治療も可能であるが、ウイルス性脳障害は有効な治療法がほとんど確立されていない。現在、神経科学の分野で多くの神経細胞特異的な栄養因子、受容体分子、転写因子をコードする遺伝子が単離されてきているが、損傷された複雑な生命現象を制御する中枢神経系を三次元的に修復する方法は未だ確立されていない。

さらに、近年、ウイルス性脳障害は増加している。なぜならば、HIV 感染症の増加、悪性腫瘍に対する化学療法が発達等による免疫不全状態における日和見感染症としての脳炎・脳症が増加しているためである。また、骨髄を代表とする移植治療に伴い脳炎・脳症の頻度は増加しており、ウイルスに起因する脳障害を克服することが、ひいては移植医療の正否を決めることになる。

本研究では、まず JCV が高い神経親和性を有するメカニズムを、ウイルス受容体、ウイルスゲノムの転写調節領域の遺伝子配列、転写因子レベルから解明し、得られた基礎的事実に基づいて脳組織特異的に種々の分子を発現させ得るウイルスベクターを作成することにより、ウイルス性脳障害の治療法を開発することを最終目的とする。

### 研究方法:

#### (1) JCV 受容体の単離

JCV の受容体の単離は以下に述べる。

- 1) 人工ウイルスを用いたオーバーレイアッセイ法
- 2) 許容細胞膜画分を抗原としたモノクローナル抗体を作製し、外殻蛋白 VP1 から作製した人

工ウイルスを蛍光標識し、膜面分への結合を抑制する ELISA 法を用いて人工ウイルスと膜面分の結合を抑制する抗体を単離して、その認識する蛋白を同定する方法で行っている。

人工ウイルスは大腸菌およびバキュロウイルスを用いた系で JCV 外殻蛋白である VP1 を発現させ、JCV の外殻蛋白を用いて作成した人工ウイルス (JCV のウイルス遺伝子を含まない殻だけの粒子) を作成し、粒子の形態をとることを電子顕微鏡、免疫電顕で確認した。さらに人工ウイルスが霊長類のみならず、マウスやラット等のげっ歯類細胞等に対して幅広く細胞内に侵入し核内へ到達すること、この侵入はシアリダーゼにより消失することを蛍光色素で標識した人工ウイルスを用いて明らかにした。

この人工ウイルスを用いて糖蛋白、糖脂質との結合をオーバーレイアッセイで検索して、ウイルス受容体の本体はシアル酸であることを明らかにした。

現在、許容細胞膜面分を抗原としたモノクローナル抗体を作製し、外殻蛋白 VP1 から作製した人工ウイルスを蛍光標識し、膜面分への結合を抑制する ELISA 法を用いて人工ウイルスと膜面分の結合を抑制する抗体を単離している。

## (2) 神経特異的転写因子の同定

JCV感染細胞からJCVの種々のクローンを単離した後、調節領域をPCR法を用いて増幅し、シーケンサーにより塩基配列を決定する。これら種々のクローンの調節領域の塩基配列を比較することにより、全てのクローンで共通している塩基配列を決定して、JCVの転写に最小限必要である配列を決定する。この配列を基にしてプローブを互いに重なる様に作成する。このプローブを用いてJCV感染が可能である神経系細胞および感染が起こらない非神経系細胞の核分画を抽出してゲルシフトアッセイを行ない、差異が有るプローブを決定する。さらにUVクロスリンク法を用いてプローブと特異的に結合する蛋白をバンドとして認識し、種々のカラムを用いて転写因子を単離する。

## (3) JCV の後期蛋白 agnoprotein (agno) に関する研究。

機能が不明である JCV agnoprotein の核移行・核外移行シグナルの変異体を作製して agnoprotein の局在の変化およびリン酸化と細胞内局在との関係について検討する。

## (4) 細胞内シグナル伝達機構の解析

“脳を守る”という研究を推進して行く上での基礎として、細胞内の蛋白の制御機構を解明することを目的としてキメラ蛋白SYT-SSX1のクロマチンリモデリング因子との相互作用を明らかにする。

## (5) 多動性障害モデルラットの解析

北海道大学染色体研究所との共同実験で既に特許を取得した注意欠陥多動性障害 (Attention deficit hyperactive disorder; ADHD)のモデルラット(wiggling rat)の比較遺伝子地図を作成し、原因遺伝子の単離を進めている。

結論:

## (1) JCV 受容体

作成した人工ウイルスおよび JCV を種々の細胞に吸着させる実験を行ない、JCV は霊長類のみならず、マウスやラット等のげっ歯類細胞等に対して幅広く細胞内に侵入し核内へ到達すること、こ

の侵入はシアリダーゼにより消失することを明らかにした (Virology, 2001, 286: 100-112)。さらにこの人工ウイルスを用いて糖蛋白、糖脂質との結合をオーバーレイアッセイで検索して、ウイルス受容体の本体はシアル酸であることを明らかにした (submitted)。

以上の結果から JCV の脳組織特異性は受容体非依存性であり、神経特異的転写因子等により特異性が規定されていることが示唆された。

## (2) 神経特異的転写因子

Adult T-cell leukemia/lymphoma の患者で PML 病変が高度であったことから、HTLV-I Tax が JCV を活性化するという仮説を立て、解析を行なった。その結果 Tax は JCV 調節領域の NF-kappa B 結合領域を介して JCV を活性化することを証明した。またこの活性化が神経系細胞特異的であることを NF-kappa B 結合領域をプローブとしたゲルシフトアッセイを行ない、その機序を解明した (J Biol Chem, 275:17016-17023, 2000)。現在ゲルシフトアッセイにより、神経系細胞および感染が起らない非神経系細胞の間で差異が有る DNA 配列が同定され、UV クロスリンク法を用いてプローブと特異的に結合する蛋白をバンドとして認識し、種々のカラムを用いて転写因子を単離し、現在その配列を確認している。

## (3) JCV の後期蛋白 agnoprotein (agno) に関する研究。

機能が不明である agno の抗体を作製して、感染細胞での agno の局在が主に核周囲の細胞質であり、細胞質ではチュブリンと結合していること、agno 欠損ウイルスはウイルス蛋白の翻訳が抑制されること、agno は JCV 早期蛋白である large T 抗原に結合することを報告した (特願 2001-356836 号、Acta Neuropathol (2002, in press), J Neurovirol 7: 302-306, 2001、J Virol, 2001, 75: 1476-1486)。また核移行・核外移行シグナルの変異体を用いた実験より、agno の細胞質局在は核外移行シグナルに依存すること、核移行シグナルもその機能を保持していることが示された。また agno は 5 ヶ所のリン酸化部位を有していた。このうち 3 ヶ所は核移行シグナルの近傍に位置し、リン酸化の有無は局在の変化に関与しなかった。感染細胞における agno の局在および局在化シグナルの検討から、agno は核内外を移行するシャトル蛋白であり、核内で JCV の複製を制御していることが示唆された。

## (4) 細胞内シグナル伝達機構の解析

SYT-SSX1 発現誘導細胞株を樹立して形質転換能がクロマチンリモデリング因子 hBRM を介して細胞を形質転換していることを明らかにし報告した (特願 2002-050894 号、Proc Natl Acad Sci USA 98, 3843-3848, 2001)。

## (5) 多動性障害モデルラットの解析

肝炎・肝癌のモデルである LEC (Long Evans Cinnamon) rat の中から異常行動を示す rat (wiggling rat) を見出し、遺伝学的解析によりその行動異常が Wilson 病とは異なった単一遺伝子による病態であることを確認し、その遺伝子を有する congenic rat を樹立した。このラットの特許を取得し (特願平:11-375380)、その後報告した (Comp Med 51: 245-251, 2001)。

### 3. 研究実施体制

#### 北海道大学大学院医学研究科グループ

① 研究分担グループ長名

長嶋和郎(北海道大学大学院医学研究科分子細胞病理学、教授)

② 研究項目

JCV の受容体および転写・複製調節因子の同定。神経特異的 vector を用いたウイルス脳炎・脳症の治療法の開発。

#### 国立感染症研究所グループ

① 研究分担グループ長名

倉田毅(国立感染症研究所感染病理部、副所長)

② 研究項目

JCV の神経特異的転写・複製調節因子の研究。

#### 国立循環器病センター研究所グループ

① 研究分担グループ長名

望月直樹(国立循環器病センター研究所循環器形態部、部長)

② 研究項目

JCV agnoprotein の解析・細胞内シグナル伝達機構の解析。

#### 大阪大学微生物病研究所グループ

① 研究分担グループ長名

大場雄介(大阪大学微生物病研究所腫瘍ウイルス分野、助手)

② 研究項目

神経特異的 vector を用いたウイルス脳炎・脳症の治療法の開発・細胞内シグナル伝達機構の解析。

### 4. 研究成果の発表

#### (1) 論文発表

- Ishimori N, Iwabuchi K, Fujii S, Watano K, Iwabuchi C, Ato M, Chiba H, Tanaka S, Kitabatake A, Onoe K : Mixed allogeneic chimerism with wild-type strains ameliorates atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. J Leukoc Biol. 69(5) : 732-40, 2001
- Furuta Y, Ohtani F, Sawa H, Fukuda S, Inuyama Y : Quantitation of varicella-zoster virus DNA in patients with Ramsay Hunt syndrome and zoster sine herpete. J Clin Microbiol. 39(8) : 2856-9, 2001
- Hayashi H, Endo S, Suzuki S, Tanaka S, Sawa H, Ozaki Y, Sawamura Y, Nagashima K : JC virus large T protein transforms rodent cells but is not involved in human medulloblastoma. Neuropathology. 21(2) : 129-37, 2001
- Ishii N, Hiraga H, Sawamura Y, Shinohe Y, Nagashima K : Alternative EWS-FLI1 fusion gene

- and MIC2 expression in peripheral and central primitive neuroectodermal tumors. *Neuropathology*. 21(1) : 40-4, 2001
- Iwasaki Y, Hida K, Nagashima K : Cauda equina xanthogranulomatosis. *Br J Neurosurg*. 15(1) : 72-3, 2001
  - Masuko H, Jin MB, Horiuchi H, Suzuki T, Taniguchi M, Shimamura T, Fukai M, Magata S, Ogata K, Ishikawa H, Fujita M, Nagashima K, Furukawa H, Todo S : Protective effect of angiotensin II type I receptor antagonist, CV-11974, on ischemia and reperfusion injury of the liver. *Transplantation*. 27;71(8) : 1034-9, 2001
  - Miyasaka T, Morishima-Kawashima M, Ravid R, Heutink P, van Swieten JC, Nagashima K, Ihara Y : Molecular analysis of mutant and wild-type tau deposited in the brain affected by the FTDP-17 R406W mutation. *Am J Pathol*. 158(2) : 373-9, 2001
  - Nagai M, Tanaka S, Tsuda M, Endo S, Kato H, Sonobe H, Minami A, Hiraga H, Nishihara H, Sawa H, Nagashima K : Analysis of transforming activity of human synovial sarcoma-associated chimeric protein SYT-SSX1 bound to chromatin remodeling factor hBRM/hSNF2 alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98(7) : 3843-8, 2001
  - Nagashima T, Kato H, Maguchi S, Chuma T, Mano Y, Goto Y, Nonaka I, Nagashima K : A mitochondrial encephalo-myo-neuropathy with a nucleotide position 3271 (T-C) point mutation in the mitochondrial DNA. *Neuromuscul Disord*. 11(5) : 470-6, 2001
  - Nakakubo Y, Okushiba S, Ohno K, Ito K, Sato K, Morikawa T, Kondo S, Kato H, Ito T, Nagashima K : True carcinosarcoma of the esophagus with osteosarcoma. *Hepatogastroenterology*. 48(37) : 137-9, 2001
  - Ohba Y, Ikuta K, Ogura A, Matsuda J, Mochizuki N, Nagashima K, Kurokawa K, Mayer BJ, Maki K, Miyazaki J, Matsuda M : Requirement for C3G-dependent Rap1 activation for cell adhesion and embryogenesis. *EMBO J*. 20(13) : 3333-41, 2001
  - Safak M, Barrucco R, Darbinyan A, Okada Y, Nagashima K, Khalili K : Interaction of JC virus agno protein with T antigen modulates transcription and replication of the viral genome in glial cells. *J Virol*. 75(3) : 1476-86, 2001
  - Tanaka S, Katano H, Tsukamoto K, Jin M, Oikawa S, Nishihara H, Sawa H, Sawada K, Shimizu M, Sata T, Fujioka Y, Nagashima K : HHV8-negative primary effusion lymphoma of the peritoneal cavity presenting with a distinct immunohistochemical phenotype. *Pathol Int*. 51(4) : 293-300, 2001
  - Watanabe Y, Shimizu M, Itoh T, Nagashima K : Intraglandular necrotic debris in gastric biopsy and surgical specimens. *Ann Diagn Pathol*. 5(3) : 141-7, 2001
  - Zaman AK, Fujii S, Sawa H, Goto D, Ishimori N, Watano K, Kaneko T, Furumoto T, Sugawara T, Sakuma I, Kitabatake A, Sobel BE : Angiotensin-converting enzyme inhibition attenuates hypofibrinolysis and reduces cardiac perivascular fibrosis in genetically obese

- diabetic mice. *Circulation*. 103(25) : 3123–8, 2001
- Okada Y, Endo S, Takahashi H, Sawa H, Umemura T, Nagashima K: Distribution and function of JCV agnoprotein. *J Neurovirol* 7: 302–306, 2001
  - Ohwatari R, Iwabuchi K, Iwabuchi C, Morohashi T, Sawa H, Hioki K, Kobayashi K, Fukuda S, Inuyama Y, and Onoe K. Developmental and functional analyses of CD8+ NK1.1+ T cells in the class I restricted TCR transgenic mice. *Cell Immunol*. 213: 24–33, 2001
  - Nagashima T, Mori M, Fujimoto M, Nunomura M, Sakurai Y, Okada Y, Itoh T, Sawa H, Stan AC, Nagashima K: Adult T-cell lymphoma involving the leptomeninges associated with a spinal cord schwannoma. *Neuropathology* 21, 229–235, 2001
  - Xie Z, Koyama T, Suzuki J, Fujii Y, Togashi H, Sawa H, Nagashima K: Coronary reperfusion following ischemia. Different expression of Bcl-2 and Bax proteins, and cardiomyocyte apoptosis. *Jpn Heart J* 42: 759–770, 2001
  - Ohnishi J, Ohnishi E, Jin M, Hirano W, Nakane D, Matsui H, Kimura A, Sawa H, Nakayama K, Shibuya H, Nagashima K, Takahashi T : Cloning and Characterization of a Rat Ortholog of MMP-23 (Matrix Metalloproteinase-23), a Unique Type of Membrane-Anchored Matrix Metalloproteinase and Conditioned Switching of Its Expression during the Ovarian Follicular Development. *Mol Endocrinol* 15(5):747–764, 2001
  - Suzuki S, Sawa H, Komagome R, Orba Y, Yamada M, Okada Y, Ishida Y, Nishihara H, Tanaka S, Nagashima K : Broad distribution of the JC virus receptor contrasts with a marked cellular restriction of virus replication. *Virology* 20;286(1):100–12,2001
  - Nakamura K, Jeong SY, Uchihara T, Anno M, Nagashima K, Nagashima T, Ikeda S, Tsuji S, Kanazawa I : SCA17, a novel autosomal dominant cerebellar ataxia caused by an expanded polyglutamine in TATA-binding protein. *Hum Mol Genet* 1;10(14):1441–8,2001
  - Kamimura E, Ueno Y, Tanaka S, Sawa H, Yoshioka M, Ueno K, Inoue T, Xiaobai L , Koyama T, Ishikawa R, Nagashima K : New Rat Model for Attention Deficit Hyperactive Disorder(ADHD) Comorbid. *Medicine* 51 (3) :245–251, 2001
  - Shirane M, Sawa H, Kobayashi Y, Nakano T, Kitajima K, Shinkai Y, Nagashima K, Negishi : I Deficiency of phospholipase C- $\gamma$ 1 impairs renal development and hematopoiesis. *Development* 128, 5173–5180, 2001
  - Mochizuki N, Yamashita S, Kurokawa K, Ohba Y, Nagai T, Miyawaki A, Matsuda M : Spatio-temporal images of growth-factor induced activation of Ras and Rap1. *Nature*. 411(6841), 1065–1068, 2001
  - Fujioka Y, Taira T, Maeda Y, Tanaka S, Nishihara H, Iguchi-Arigo SM, Nagashima K, Ariga H : MM-1, a c-Myc-binding protein, is a candidate for a tumor suppressor in leukemia/lymphoma and tongue cancer. *J Biol Chem*. 30, 276(48) : 45137–44, 2001
  - 田中伸哉、長井真人、平賀博明、長嶋和郎:滑膜肉腫関連キメラ遺伝子 SYT-SSX の癌化機

構。病理と臨床・別冊 Vol.19 No.7, 2001

- Kobayashi Y, Watanabe M, Okada Y, Sawa H, Takai H, Nakanishi M, Kawase Y, Suzuki H, Nagashima K, Ikeda K, Motoyama N: Hydrocephalus, *situs inversus*, chronic sinusitis, and male infertility in DNA polymerase  $\lambda$ -deficient mice: Possible implications for the pathogenesis of immotile cilia syndrome. *Mol Cell Biol* 22: 2769-2776, 2002.
  - Okamoto T, Tanaka S, Alex C. Stan, Koike T, Kase M, Makita Z, Sawa H, Nagashima K : Advanced Glycation End Products Induce Angiogenesis in Vivo. *Microvascular Research*. 63, 186-195, 2002
  - Tsuda, M., Tanaka, S., Sawa, H., Hanafusa, H., and Nagashima: Signalling adaptor protein v-Crk activates Rho and regulates cell motility in 3Y1 rat fibroblast cell line. *Cell Growth Diff* 13: 131-139, 2002
  - Nishihara H, Tanaka S, Tsuda M., Oikawa S, Maeda M, Shimizu M, Shimoyama H, Tanigami A, Sawa H, Nagashima K: Molecular and immunohistochemical analysis of adaptor protein Crk in human cancers. *Cancer Letter* 180, 55-61, 2002
  - 大場靖子、澤洋文、長嶋和郎 : JC virus の分子神経病理学 脳と神経。54(2), 101-109, 2002
- (2) 特許出願  
国内 2 件、海外 1 件